



(21) 申请号 201580064820.X

C07K 16/46 (2006.01)

(22) 申请日 2015.12.08

C07K 19/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107108718 A

(56) 对比文件

US 2012294857 A1,2012.11.22

US 2012294857 A1,2012.11.22

(43) 申请公布日 2017.08.29

CN 104066845 A,2014.09.24

(30) 优先权数据

Mancardi, D.A. et al..high affinity

62/089,097 2014.12.08 US

immunoglobulin gamma Fc receptor I

62/200,557 2015.08.03 US

precursor [Homo sapiens].《GenBank

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.06.06

Database》.2013,ORIGIN部分.

范冬梅等.双功能抗体抗CD3/抗CD19介导T
细胞对靶细胞的杀伤作用.《中国癌症杂志》
.2011,第21卷(第1期),第6-11页.

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/064572 2015.12.08

A Biglari et al..Human monocytes

(87) PCT国际申请的公布数据

expressing a CEA-specific chimeric CD64

W02016/094456 EN 2016.06.16

receptor specifically target CEA-

(73) 专利权人 北京强新生物科技有限公司
地址 100083 北京市海淀区学院路30号科
大天工大厦B座8层01-15室

expressing tumour cells in vitro and in

vivo.《Gene Therapy》.2006,第13卷(第7期),第
602页右栏第1段和第2段.

(72) 发明人 C·J·李 S·乌尼拉曼

审查员 何春征

(51) Int.Cl.

C07K 14/735 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图10页

(54) 发明名称

可溶性通用的增强ADCC的合成融合基因和
融合肽的技术及其应用

(57) 摘要

提供新的基于合成生物学的ADCC技术,例
如,通过合理设计的可溶性通用的ADCC增强子蛋
白(SUAEP),其高亲和力的CD3-结合结构域与高
亲和力的Fc-结合结构域融合,以增强或确保
ADCC反应。SUAEP技术能用于预防或治疗癌症、传
染性疾病、炎症性的或自身免疫疾病,和需要消
除病变细胞的其他疾病。

结合抗体



连接T细胞

CD16

CD32

CD64

1. 一种融合蛋白,由高亲和力的Fc-结合结构域,高亲和力的CD3-结合结构域,和连接序列组成;

其中所述高亲和力的Fc-结合结构域与所述高亲和力的CD3-结合结构域通过连接序列融合;

其中所述高亲和力的Fc-结合结构域包括人CD64的胞外域的全部,所述人CD64的胞外域的全部具有SEQ ID NO:1第16-281位的氨基酸序列;

其中所述高亲和力的CD3-结合结构域是抗-CD3单克隆抗体的scFv,所述抗-CD3单克隆抗体scFv能够结合CD3⁺T细胞,所述CD3⁺T细胞能够被活化;

其中所述连接序列是柔性的连接序列。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述抗-CD3单克隆抗体选自OKT3、去免疫化和人源化的OKT3。

3. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白的氨基酸序列是SEQ ID NO:3。

4. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述高亲和力的Fc-结合结构域的氨基酸序列是SEQ ID NO:1。

5. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述柔性的连接序列是丝氨酸-甘氨酸连接子。

6. 一种药物组合物,包含:

(i) 权利要求1-3任一项所述的融合蛋白,和药学上可接受的赋形剂;或

(ii) 编码权利要求1-3任一项所述的融合蛋白的DNA或RNA构建体,和药学上可接受的赋形剂。

7. 权利要求6所述的药物组合物在制备用于治疗性治疗有此需要的受试者状况的药物中的用途,所述用途包含给所述受试者施用治疗有效量的所述的药物组合物,所述状况选自癌症、炎症性疾病、自身免疫疾病、移植排斥和感染。

8. 权利要求7所述的用途进一步包含施用针对至少一种指示所述状况的细胞表面抗原的治疗性抗体。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述细胞表面抗原选自CD19、CD20、CD33、EpCAM、HER2/neu、PD-L1、PD-1和CTLA-4。

10. 根据权利要求8所述的用途,其中所述治疗性抗体包含人IgG4的Fc区。

11. 根据权利要求8所述的用途,其中所述治疗性抗体选自西妥昔单抗、曲妥珠单抗和纳武单抗。

12. 权利要求6所述的药物组合物在制备用于预防性治疗有此需要的受试者状况的药物中的用途,所述用途包含给所述受试者施用预防有效量的所述的药物组合物,所述状况选自癌症。

13. 权利要求12所述的用途进一步包含施用针对所述状况的疫苗。

可溶性通用的增强ADCC的合成融合基因和融合肽的技术及其应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2014年12月8日提交的序列号为62/089,097和2015年8月3号提交的序列号为62/200,557的共同待审的美国临时专利申请的优先权和权益,所述申请的全部内容并入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及可用于能使免疫效应细胞(特别是T细胞)介导抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)的合成生物学产品和方法,及它们用于治疗 and 预防癌症、传染性疾病、炎症性和自身免疫疾病和其他疾病的方法。

背景技术

[0004] 哺乳动物,特别是包括人类的高等脊椎动物,已经发展出高度复杂的免疫系统,使用多种机制和效应器来检测、破坏、或至少控制外来病原体及病变的或应激的自体细胞。这些病变细胞可能已经被病毒或细菌感染,或已经变成癌性的。

[0005] 免疫系统识别和消除病变的宿主细胞及侵入细胞内的微生物(例如,病毒、细菌或寄生虫)的机制之一是通过细胞介导的细胞毒作用,其可以由若干白细胞和蛋白实施。这些潜在的细胞毒性效应器包括:来自淋巴系的——自然杀伤(NK)细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTLs);和来自骨髓系的——巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0006] 免疫系统启动细胞介导的细胞毒作用的一个重要途径依赖于抗体。过去十年,靶向于肿瘤特异性细胞表面的蛋白的单克隆抗体(mAbs)成为受欢迎的抗癌治疗方法。一些mAbs已经进入常规临床实践,包括利妥昔单抗(Rituxan, Mabthera)、曲妥珠单抗(Herceptin)和西妥昔单抗(Erbitux)。mAbs因其双功能的性质而受欢迎。可以使抗体的一端(Fab)精确地针对特定肿瘤蛋白而不改变招募各种效应细胞和蛋白来杀死肿瘤细胞的另一端(Fc)。

[0007] 具体地,抗体首先识别和结合靶细胞表面抗原后,充当接头蛋白(adapter),通过与那些免疫效应细胞的某些受体的第二结合继而激活免疫效应细胞的细胞毒性能力。这就是所谓的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。例如,在抗癌的固有免疫中,ADCC主要由表达相对低亲和力的Fc受体(Fc γ RIIIa,又称为CD16a)的自然杀伤(NK)细胞(和,较少程度上的中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞)介导,Fc受体只有通过覆盖在靶病变细胞(例如,肿瘤细胞)上的多价抗原的抗体的Fc片段结合才被激活。这一结合引起如穿孔素和颗粒酶(及很多细胞因子,包括IFN- γ)细胞毒性颗粒的释放,导致靶细胞的溶解。体外实验和动物实验已经显示了ADCC的重要性。此外,一些临床研究显示,携带更低亲和力的CD16变体(F158)的患者具有更差的临床预后。

[0008] 然而,主要由内源的自然杀伤(NK)细胞介导的ADCC的疗效在体内是局限的(就完全由内源的细胞毒性T淋巴细胞参与肿瘤清除而言,发现其疗效也是非常局限和不足的),

归因于许多生理及病理原因,解释如下。

[0009] 第一,参与ADCC的大部分细胞,例如,巨噬细胞和中性粒细胞,在被激活时不倾向于增殖。NK细胞对激活的反应同样具有有限的增殖潜能,并且它们也迅速地死亡。因此,即使ADCC效应器识别覆盖病变细胞的抗体,体内的固有ADCC应答仍然有抵不过疾病进展(例如,病毒感染、癌症)的风险。

[0010] 第二,许多ADCC效应细胞也表达抑制性受体以减弱它们的免疫应答,从而建立制衡系统。这些受体包括对CD56^低的NK细胞的抑制性KIRs(杀伤细胞免疫球蛋白样受体)、单核细胞和B细胞上的Fc γ RIIb、和对T细胞的CTLA-4(CD152)和PD-1(程序性-死亡-1,CD279)。癌细胞和病毒通过异常地放大这些抑制性通路来抵消体内的基于ADCC的防御系统。

[0011] 第三,ADCC效应细胞上的主要Fc受体,Fc γ RIIIa(CD16a),对抗体有相对低的亲和力($K_d \approx 10^{-6}$ M)——与受体的无效F158型相比,即使受体的V158变体仅具有高两倍的亲和力。通过这一机制,一旦细胞表面靶标降低于特定水平,则癌细胞变得对一些治疗性单克隆抗体(mAbs)有抵抗力。

[0012] 鉴于其在疾病(例如,癌症或其他疾病)中增殖和亲和力的天然局限性及通过抑制性Fc受体的进一步衰退,体内的ADCC功能具有的巨大潜力从未被完全实现。因此,合成生物学代表新的和高度期望的方法,在预防和治疗人类疾病中释放ADCC活性的所有潜能。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明引进新方法以提高免疫系统对癌症、传染性疾病和其他疾病的防御。本发明设计了新型、自由结合的、接头蛋白样的ADCC增强子,把细胞毒作用和T细胞的增殖潜能结合到基于抗体的治疗中。

[0015] 根据本发明,提供融合蛋白作为自由结合和循环的接头蛋白,使靶向病变细胞(例如,肿瘤细胞)的抗体与CD3⁺T细胞接触。该新的接头蛋白分子是可溶性的,且可以注射到患者的血液,进入大部分的组织室。该接头蛋白样ADCC增强子有如下两个组分:(a)高亲和力的Fc-结合结构域;和(b)高亲和力的CD3-结合结构域。方法的原理是:该接头蛋白样ADCC增强子将结合已经覆盖了一种或多种治疗性抗体的肿瘤细胞,该增强子同样可以结合CD3⁺T细胞。一旦很靠近或接触T细胞,覆盖肿瘤细胞的抗体将引起T细胞表面的CD3s交联,导致T细胞活化,最终溶解肿瘤细胞。

[0016] 本发明的ADCC增强子可以与抗体疗法联合使用或靶向被天然存在的抗体识别或结合的病变细胞单独使用。

[0017] 在第一方面,本发明着手于建立高亲和力的Fc受体或抗体片段,例如与野生型人CD16(例如,最普遍的CD16型,即普遍的F158变体)相比对天然抗体有更高亲和力的那些。受体(在下文中作为术语以包含类似于更加传统的细胞表面受体的实施方案和基于抗体片段的实施方案),其部分或全部,可以来自免疫系统的另一大分子或重新设计。高亲和力的Fc受体能够与抗体共有的Fc片段有效结合,靶向广泛的多种细胞表面抗原并由此靶向广泛的多种疾病和适应症。与抗原依赖性免疫疗法(其每次需要针对每个具体的抗原建立不同的抗体)相比,这有极大的优势。

[0018] 在另一方面,重点建立可溶性的、接头蛋白样的ADCC增强子,高亲和力的CD3-结合结构域与Fc-结合结构域或第一方面中描述的高亲和力的受体融合。此高亲和力的CD3-结合结构域的例子包括OKT3和新型抗CD3的scFv。在不同的实施方案中,高亲和力的Fc-结合

结构域可以选自CD64的胞外域、高亲和力的CD16变体和对人Fc有高亲和力的抗体片段。

[0019] 在另一方面,本发明提供药物组合物,其包括本发明的融合蛋白,依次含有高亲和力的Fc-结合结构域和高亲和力的CD3-结合结构域。该药物组合物进一步包括药学上可接受的赋形剂。

[0020] 在相关方面,本发明提供治疗性治疗有此需要的受试者状况的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本发明的药物组合物。方法可以进一步包括施用针对至少一种表示所述状况的细胞表面抗原的治疗性抗体。在一个实施方案中,抗体包含与人IgG4基本上相似的Fc区。治疗的状况可以是癌症、炎症性疾病、自身免疫疾病、移植排斥和感染等。

[0021] 在又一个方面,本发明提供预防性治疗有此需要的受试者状况的方法,所述方法包含给所述患者施用预防有效量的本发明的药物组合物。方法可以进一步包括施用针对所述状况的疫苗。在一个实施方案中,状况是癌症。

[0022] 附图简述

[0023] 据本发明,图1示例性地描述了接头蛋白样的ADCC增强子。

[0024] 图2示例性地描述了CD64和CD16的外显子。CD64有额外的免疫球蛋白折叠,因此,外显子在胞外区。该额外的折叠是CD64更高Fc亲和力的保证。

[0025] 根据本发明的实施方案,图3列出了接头蛋白样的ADCC增强子的Fc-结合结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。具体地,在这个实施方案中该结构域包括基于外显子边界的CD64胞外域。

[0026] 根据本发明的实施方案,图4列出了接头蛋白样的ADCC增强子的抗-CD3结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。具体地,在这个实施方案中该结构域包括两个间隔区/连接区序列(下划线)和OKT3序列的人源化形式。

[0027] 根据图3和图4中展示的实施方案,图5列出了接头蛋白样的ADCC增强子的全部氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。

[0028] 根据图5展示的实施方案,图6列出了接头蛋白样的ADCC增强子的全部DNA序列(SEQ ID NO:4)。

[0029] 图7是免疫印迹(蛋白印迹)的摄影图像,显示了在Expi293细胞中过表达两种形式的可溶性、接头蛋白样的ADCC增强子的时间进程。两种形式都有相同的CD64-OKT3融合蛋白序列,唯一不同的是它们各自的核酸序列(泳道1和2)。蛋白被分泌到介质中。预测的分子质量为58kDa;可能由于糖基化,抗-CD64抗体选择了具有75kDa的带。

[0030] 图8是考马斯-染色凝胶的摄影图像,示出了用商品化的人IgG柱(GE Life Sciences)纯化可溶性的ADCC增强子。通过多步离心分离、超滤,从培养基的上清液中完全移除转染的细胞。柱在中性缓冲液中平衡,上样上清液,然后溢流(flow-through)(确保完全结合)。蛋白通过梯度减少的pH分步纯化。纯化蛋白立即在高摩尔浓度的碱性Tris缓冲液中中和。纯化蛋白通过连续透析或用Amicon®Ultra Centrifugal超滤器重复超滤转移到PBS中。右边的凝胶泳道展示了当洗涤缓冲液在pH 3.05时不同的洗脱片段。

[0031] 图9示例性地描述了用Jurkat细胞检测本发明的接头蛋白样的ADCC增强子对CD3⁺免疫效应细胞的结合能力的试验。

[0032] 根据图9的试验,图10示出FACS的数据显示,Jurkat细胞与纯化前(“样品上样”)和

纯化后(“纯化蛋白”)的本发明的ADCC增强子之间的结合。未填充的曲线表示阴性对照。除非另有说明,此处和所有后续的实验,纯化的ADCC增强子以10-20ng/ μ l使用。

[0033] 图11示出FACS数据显示,Jurkat细胞与不同浓度的本发明的ADCC增强子之间的结合滴定。增强子的体积(以 μ l记)显示在六幅图的右上角,为:50、25、12.5、6.25、3.13和1.56 μ l。下表总结了该数据。 CD^+ Jurkat细胞与不同量的增强子一起培养,在PBS中清洗细胞移除过量的增强子,用荧光的抗-人CD64抗体检测结合了增强子的蛋白。

[0034] 图12示例性地描述了用Daudi细胞检测本发明的接头蛋白样的ADCC增强子对覆盖Rituxan的 $CD20^+$ 靶细胞的结合能力的试验。

[0035] 根据图12的试验,图13示出FACS的数据显示,Daudi细胞与纯化前(“样品上样”)和纯化后(“纯化蛋白”)的本发明的ADCC增强子之间的结合。

[0036] 图14示出FACS数据显示,Daudi细胞与不同浓度的本发明的ADCC增强子之间的结合滴定。增强子的体积(以 μ l记)显示在六幅图的右上角,为:50、25、12.5、6.25、3.13和1.56 μ l。下表总结了该数据。 $CD20^+$ Daudi细胞由Rituxan(抗- $CD20$ 抗体)覆盖,在PBS中清洗细胞移除过量的Rituxan。Rituxan-覆盖的细胞与不同量的增强子一起培养,在PBS中清洗细胞移除过量的增强子,用荧光的抗-人CD64抗体检测结合了增强子的蛋白。与 $CD20$ 相比,观察到ADCC增强子对抗体约有30倍更高的亲和力。

[0037] 图15示例性地描述了用覆盖了Rituxan的Daudi细胞和 $CD8^+$ T细胞检测本发明的接头蛋白样的ADCC增强子介导和扩大抗靶癌细胞的细胞毒性的能力的试验。

[0038] 根据图15的试验,图16示出FACS的数据显示靶(Daudi)细胞(上簇)和效应T细胞(下簇)的检测。数据表明本发明的增强子能招募T细胞裂解许多的Daudi细胞群而不衰减T细胞活性(右图)。在这及所有后续试验中,E:T(效应细胞:靶细胞)比例为10。

[0039] 图17示出细胞毒性实验的数据,包括两种浓度的Rituxan(抗- $CD20$)、 $CD20^+$ Daudi细胞、 $CD8^+$ T细胞和本发明的增强子。数据显示增强子增加了T细胞对靶细胞的杀伤,杀伤依赖于Rituxan和增强子的浓度。天1和天2之间的数据表明,更长时间暴露同样增加了杀伤(时间依赖的ADCC)。Rituxan以0.1 μ g/ml (10x)或0.01 μ g/ml (1x)使用。增强子以12.5 μ l (+)或50 μ l (+++)使用。

[0040] 图18示出细胞毒性实验的数据,包括两种浓度的Rituxan、Raji细胞、 $CD8^+$ T细胞和本发明的增强子。数据显示与图17中在相同的Rituxan和增强子的浓度下类似的结果。

[0041] 图19示出细胞毒性实验的数据,包括两种浓度的Herceptin、 HER^+ SK-BR3细胞、 $CD8^+$ T细胞和本发明的增强子。当加入增强子时,数据显示更显著的细胞毒性效应(与图18中的结果相比)。Herceptin以1 μ g/ml (10x)或0.1 μ g/ml (1x)使用。增强子以50 μ l (+++)使用。

[0042] 根据本发明的实施例,图20示例性地描述如何在不同乳腺癌细胞中检测HER2的表达。

[0043] 图21对比了三种不同的乳腺癌细胞系之间的HER2表达水平:MDA-MB-231、MCF7和SK-BR3。最左边的峰表示未染色的对照,随后的峰分别是MDA-MB-231、MCF7和SK-BR3细胞的。数据显示,在这三个之间,SK-BR3有最高的HER2表达水平,而MDA-MB-231有最低的表达水平。

[0044] 图22示出细胞毒性实验的数据,包括Herceptin、 HER -高SK-BR3细胞、 HER -低MDA-MB-231细胞和本发明的增强子。数据显示在两种乳腺癌细胞型中增强子都有扩大

Herceptin的杀伤能力。数据同样显示在SK-BR3细胞中的更显著的效果,表明该效果依赖于HER2的表达水平。然而,杀死MDA-MB-231细胞的能力显示,本发明的增强子能用于使低表达HER2的肿瘤对Herceptin敏感。在这些实验中增强子以50 μ l使用。

[0045] 图23示出细胞毒性实验的数据,包括纳武单抗(抗-PD1)、转基因表达PD1的HEK-293T细胞(“293T-PD1”)、CD8⁺T细胞和本发明的增强子。其亲本(未修饰的HEK 293T细胞(“293T”))及IgG4计入对照。只有在当增强子存在时,表达PD-1的细胞接触纳武单抗,才能看见靶细胞显著的裂解。包括最左边的对照在内,CD8⁺T细胞在所有描述的样本中。

[0046] 发明详述

[0047] I. 定义

[0048] 除非另外说明,技术术语根据常规用法使用。分子生物学中的常见术语定义可在,例如,Benjamin Lewin, Genes VII, Oxford University Press出版,2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (eds.); The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell出版社出版,1994 (ISBN 0632021829); 和Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, Wiley, John & Sons, Inc. 出版,1995 (ISBN 0471186341), 和其他相似的技术参考资料中找到。

[0049] 如文中所使用的,“一个”或“一种”可以表示一个或多个。如文中所使用的,当与词语“包含”结合使用时,词语“一个”或“一种”可以表示一个或多于一个。如文中所使用的,“另一个”可以表示至少第二或更多。进一步地,除非上下文另有要求,单数术语包括复数,复数术语包括单数。

[0050] 如文中所使用的,无论是否明确指明,“大约”指数值,例如,包括整数、分数和百分数。术语“大约”通常指数值的范围(例如,所述值的 $\pm 5-10\%$),该数值范围本领域的普通技术人员会认为等同于所述值(如,有同样的功能或结果)。在一些情况下,术语“大约”包含的数值四舍五入到最接近的有效数字。

[0051] 如文中所使用的,术语“抗体”或“Ab”,广义上指任何由四条多肽链(两条重(H)链和两条轻(L)链)组成的免疫球蛋白(Ig)分子,或保留了Ig分子基本的表位结合特征的任何其功能片段、突变体、变体或衍生物。这些突变体、变体或衍生抗体形式在本领域是已知的,包括但不限于单链Fv(scFv)、Fab、F(ab')、F(ab')₂、单结构域等。其非限制性实施方案在下文讨论。

[0052] CD16表达为两种不同的形式,CD16a和CD16b,其为两个不同但高度同源基因的产物。CD16a是多肽锚定跨膜蛋白而CD16b是糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白。如本文中所使用的,CD16指该蛋白的两种形式,除非对于技术人员来说显而易见不合适。

[0053] 实施本发明所用的效应细胞可以是自体同源的、同源的或异源的,其选择依赖于所治疗的疾病和可用的方法。

[0054] II. 组合物

[0055] 本发明公开了可溶性通用的ADCC增强子蛋白(SUAEP)技术,其提供现成的、接头蛋白样、可溶性通用的增强ADCC的蛋白,理论上能普遍地用于增强抗体的疗效。增强机制可能包括至少以下方面:

[0056] 1. ADCC对抗体疗法(例如,Rituxan[®]或Herceptin[®]治疗)的效能很重要。一些研究表明低亲和力的CD16变体(158F)纯合的患者有较差的预后。

[0057] 2.即使对具有相对高亲和力的CD16变体的患者,ADCC可能如之前讨论的由于多种原因被抑制,例如,免疫抑制环境、抑制性受体的介入或效应细胞的无能力增殖。

[0058] 3.补体系统同样对Rituxan®(利妥昔单抗)的效能很重要。例如,即使CLLs是惰性B细胞癌,患者对Rituxan®经常是顽固的,因为他们或补体缺失或在Rituxan®治疗开始后不久补体耗尽(Xu et al.,2011,International Journal of Cancer 128:2193-2201; Kennedy et al.,2004,Journal of Immunology 172(5)3280-3288)。

[0059] 在所有这些情况下,添加ADCC增强子将能够避免这个问题且给癌细胞招募细胞毒性T细胞。

[0060] 另外,本发明提供的SUAEP技术在减少治疗所需抗体的数量中将是有益的,从而最小化(a)抗体的非特异副作用;并(b)减少发展抗-抗体应答的机会。应当注意的是,即使是完全人源化抗体也有独特的CDR3s能引发免疫应答。减少治疗中使用的抗体数量将减少引发该应答的机会。

[0061] T细胞接头蛋白

[0062] 根据本发明的一个实施方案,融合蛋白起着循环的、自由结合的接头蛋白样的ADCC增强子的作用,其有两个部分:结合抗体的高亲和力的Fc-结合结构域,连接T细胞的高亲和力的CD3-结合结构域(图3)。

[0063] (a)Fc结合结构域

[0064] 接头蛋白样的ADCC增强子的Fc结合结构域可以来自多种来源,包括:

[0065] (i) CD64 (Fc γ RI) 的胞外域:

[0066] Fc γ RI是高亲和力的Fc受体(对IgG1和IgG3的Kd $\approx 10^{-9}$),出现在巨噬细胞和中性粒细胞上,与抗体介导的吞噬作用和介质的释放有关。Fc γ RI包括糖蛋白 α 链,其细胞外结构域由与结合抗体有关的三个免疫球蛋白结构域组成。

[0067] 根据本发明的一个实施方案,CD64 (Fc γ RI) 的胞外域的部分或全部与合适的CD3-结合结构域融合,形成接头蛋白样的增强子,从而介导ADCC。有利地,由于胞外域源于机体,该实施方案中的增强子是同源的,因此是非免疫原性的。

[0068] (ii) 高亲和力的CD16变体:

[0069] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的接头蛋白样的ADCC增强子的Fc-结合结构域并入具有对抗体Fc片段有提高的亲和力的CD16 (Fc γ RIII) 变体的胞外域的部分或全部。在一个实施方案中,Fc-结合结构域的序列由Fc γ RIIIa的结合区的随机突变产生,并使用最常用的CD16变体(F158)作为基准对照来挑选。

[0070] (iii) 高亲和力的ScFv:

[0071] 在进一步的实施方案中,本发明的Fc-结合结构域并入改造的对Fc(优选人Fc)有高亲和力的抗体片段。在一个实施方案中,抗体片段是ScFv(单链可变区片段)。在可选的实施方案中,片段是Fab(抗原结合片段)。该抗体片段应该比基准受体(例如,CD16)展现出更高的Fc亲和力。改造这些抗体片段的方法是本领域技术人员所熟知的,例如,通过使用商购的杂交瘤。例如,将人Fc结构域注射到实验动物(例如,小鼠)中一定时间。从动物脾脏中分离的B细胞与骨髓瘤细胞融合,筛选能产生抗Fc结构域的高亲和力的单克隆抗体的克隆。这些候选的抗体可用标准方法人源化、去免疫化和/或转换成Fab或ScFv形式。可选地,通过对从具有人源化免疫系统的动物中得到的高亲和力克隆或单克隆抗体进行文库筛选(例如,

噬菌体展示、基于酵母或哺乳动物细胞), 能够获得完全人源化抗体。

[0072] (b) CD3-结合结构域

[0073] CD3-结合结构域, 优选地具有高亲和力, 同样能从多种来源制得。

[0074] 例如, 该结构域可以源自OKT3, 其是抗-CD3单克隆抗体, 是1986年第一个被批准用于人类的单克隆抗体。其是鼠源单克隆抗体, 多年来其被多次改进以同时使其人源化和使其更低免疫原性(去免疫化)。在一个实施方案中, CD3-结合结构域包含OKT3抗体的scFv部分, 优选地, 去免疫化的、人源化的(dhOKT3)形式。

[0075] 在本发明的其他实施方案中, 可以使用类似于上文(a) (iii) 部分中描述的关于高亲和力Fc-结合scFv的方法制作新型抗-CD3scFv。

[0076] 在一个优选的实施方案中, 接头蛋白样的ADCC增强子是一个融合蛋白, 其CD64胞外域与dhOKT3scFv结合。

[0077] 应当注意的是, 这一治疗剂可以用于增强商购的抗癌抗体的效能。然而, 该治疗剂同样可以用作单一疗法, 以增强由于患者固有的低ADCC活性而无法清除肿瘤的体内天然抗体的效能。

[0078] III. 治疗和疫苗

[0079] ADCC增强子对于癌症治疗的临床意义可以用人癌细胞连同商购的治疗抗体来检测。例如, 处理Daudi细胞, 用(1) 利妥昔单抗(商品名Rituxan[®]), 靶向CD20的抗体, 其涉及淋巴瘤、自身免疫疾病和移植排斥, 导致效应细胞活化、脱粒及增殖, (2) CD8⁺细胞毒性T细胞, 和(3) 本发明的接头蛋白样的ADCC增强子。在一个实施方案中, 本发明的ADCC增强子与现有的治疗抗体(例如, 利妥昔单抗) 联合使用。同样观察到靶细胞杀伤。用商购的NOD.scid.IL2R $\gamma^{-/-}$ 小鼠进行体内检测, 其有非常低的T细胞和B细胞, 且没有NK细胞。可选地, 使用具有非常低的T细胞和B细胞和减少的NK细胞的NOD.Scid小鼠。这些小鼠移植入标记的Daudi细胞, 用任何合适的成像技术观察和检测肿瘤的生长。在接受了利妥昔单抗和免疫效应细胞、转导了本发明的ADCC增强子的小鼠中观察到持续时间的肿瘤缓解、肿瘤消退或长期的无进展。

[0080] 在另一个实施例中, 处理SK-BR-3细胞或MDA-MB-231细胞, 用(1) CD8⁺细胞毒性T细胞, (2) 本发明的接头蛋白样的ADCC增强子, 和(3) 曲妥珠单抗(商品名Herceptin[®]), 靶向HER2/neu, 其涉及乳腺癌, 导致效应细胞活化、脱粒及增殖。同样观察到靶细胞杀伤。在类似于上方描述的实施例的小鼠模型中观察到ADCC增强子的体内抗肿瘤能力。

[0081] 本发明的ADCC增强子在自身免疫中的临床应用可以用针对每一具体疾病公认的小鼠模型之一来检测。例如, 在NOD小鼠中, 已显示抗体介导的B细胞缺失阻止和甚至逆转1型糖尿病。然而, 该效果受Fc受体低亲和力的限制(Hu et al. J Clin Invest. 2007, 117(12):3857-67; Xiu et al. J Immunol. 2008, 180(5):2863-75)。对照小鼠与或者单独接受抗-CD19或抗-CD20抗体的小鼠, 或者接受抗-CD19或抗-CD20抗体联合本发明的ADCC增强子的小鼠对比。接受了ADCC增强子的小鼠显示疾病发生的延迟或症状的持续逆转。

[0082] 类似的实验可以在其他小鼠模型中进行, 其中抗体介导的缺失已显示影响疾病, 例如多发性硬化、实验性自身免疫性脑脊髓炎(Barr et al. J Exp Med. 2012, 209(5):1001-10), arthritis(Yanaba et al. J Immunol. 2007, 179(2):1369-80)等。

[0083] ADCC增强子在病毒性感染(例如HIV感染)中的临床应用可以用公认的人源化小鼠

模型来检测,其中联合抗体的治疗已显示控制HIV的复制(Nature,2012,492(7427):118-22)。人源化小鼠最初通过NOD.RAG1^{-/-}.IL2R γ ^{-/-}小鼠与人胎肝源的CD34⁺造血干细胞重组形成。这些小鼠有完整的人免疫系统,可以被HIV感染且不会消极地对人抗体做出反应。感染的对照小鼠与或者单独接受中和抗体混合物的小鼠,或者接受中和抗体混合物联合任一人免疫效应细胞和本发明的接头蛋白样的ADCC增强子的小鼠对比。接受了ADCC增强子的小鼠显示病毒血症的持续减少和T细胞数量的恢复。

[0084] 检测ADCC增强子的临床疗效的可选的模型系统是猴-人免疫缺陷病毒(SHIV)感染的幼儿恒河猕猴模型,其中中和抗体已显示阻止疾病的快速发生(Jaworski et al.J Virol.2013,87(19):10447-59)。感染的对照猕猴与或者只接受中和抗体混合物的猕猴,或者接受中和抗体混合物联合本发明的接头蛋白样的ADCC增强子的猕猴对比。接受了ADCC增强子的猕猴类似地显示病毒血症的持续减少和T细胞数量的恢复。

[0085] 编码本发明ADCC增强系统的DNA和RNA构建体可以使用技术人员所知的技术配制给受试者施用。包含编码ADCC增强系统的DNA和RNA构建体的制剂可以包括药学上可接受的赋形剂。制剂中包括的赋形剂基于,例如,使用的基因构建体或效应细胞的类型和给药的模式将有不同的用途。通常使用的赋形剂的例子包括,但不限于:盐水、缓冲盐水、葡萄糖、感染水(water-for infection)、甘油、乙醇、和其组合、稳定剂、增溶剂和表面活性剂、缓冲液和防腐剂、张度剂、填充剂和润滑剂。

[0086] 在本发明的另一个实施方案中,给患者施用本发明的接头蛋白样的ADCC增强子的药物制剂。示例性给药模式包括,但不限于,静脉注射。其他模式包括,但不限于,瘤内、皮内、皮下(s.c.,s.q.,sub-Q,Hypo)、肌肉(i.m.)、腹腔(i.p.)、动脉、髓内、心脏、关节内(关节)、滑膜内(关节液区域)、颅内、脊柱内和鞘内(脊髓液)。可以使用任何已知的用于制剂的胃肠外注射或输注的设备来进行这些给药。如文中所使用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”有其普通及惯用含义,包括以下一个或多个:阻塞、减轻、或减少患者疾病(例如,癌症)症状的严重性和/或频率,和/或抑制癌细胞的生长、分裂、传播、或增殖,或抑制患者癌症进展(例如,出现新肿瘤)。相对于未使用本发明的方法的受试者,治疗指阻塞、减轻、降低或抑制约1%到约100%。优选地,相对于未使用本发明的方法的受试者,阻塞、减轻、降低或抑制是约100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或1%。

[0087] 本发明ADCC增强子的临床效果,同时作为治疗的和预防的,可以通过使用树突细胞(DCs)任选地增强。在淋巴器官中,DCs呈递抗原给辅助性T细胞,进而调节免疫效应细胞,包括CTLs、B细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和NK细胞。已有报道,改造自体同源的DC表达HIV抗原或用外源HIV蛋白冲击自体同源的DC,能够在体外致敏CTLs对抗HIV(Wilson et al.,J Immunol.,1999,162:3070-78)。因此,在本发明的一个实施方案中,首先从受试患者中分离DCs,然后通过目标抗原源培养离体致敏,例如,可以是来自于受试患者或外源的某些肿瘤相关抗原或其他表面标记物。在用感染了本发明ADCC增强系统的自体同源CTL和/或其他效应细胞、或包含编码ADCC增强系统的DNA和RNA构建体的制剂治疗之前,将这些DCs最终灌输回患者。这提供了在DCs帮助下使用ADCC增强子增强治疗及疫苗的模式。

[0088] 本发明还提供了包含一个或多个容器的试剂盒,容器填充了一定量的编码接头蛋白样的ADCC增强子的基因构建体和药学上可接受的赋形剂。该试剂盒还可以包括使用说明

书。进一步地,与试剂盒相关的可以是一个通知,以管理药品或生物产品的生产、使用或销售的政府机构规定的形式,其通知反映该机构批准生产、使用或销售用于人类施用。

IV. 实施例

[0089] (1) T细胞接头蛋白构建

[0090] 根据本发明的多个实施方案,开发和检测了接头蛋白样的ADCC增强子,即,具有高亲和力的Fc-结合结构域连接高亲和力的CD3-结合结构域的融合蛋白。

[0091] 具体地,合成的CD64-dhOKT3 DNA首先通过化学合成生成,作为遗传物质来产生接头蛋白样的ADCC增强子(或,可溶的、自由结合的、循环的T细胞接头蛋白),其中该CD64的Fc-结合胞外域与Orthoclone OKT3(又名莫罗单抗-CD3)(抗-CD3的抗体)的去免疫化和人源化的scFv形式融合。

[0092] 其他的Fc-结合结构域,例如,基于其他Fc受体(例如,CD32和CD16)的胞外域,即细胞外结构域,也可以被用于本发明的其他实施方案中。然而,CD64(即Fc γ RI)对抗体的Fc区的亲和力比CD16高约100倍至1000倍,这使CD64的胞外域(CD64与抗体结合有关的部分)是融合蛋白中Fc-结合结构域的优选候选者。

[0093] 蛋白融合的连接处由原蛋白的外显子边界决定(见图2)。融合蛋白的CD64结构域包括两个编码分泌信号的外显子接着三个编码胞外域的外显子,如图3中SEQ ID NO:1所示。分泌信号序列无需来自CD64,然而,可以被其他合适的分泌信号序列所取代。此外,在可选的实施方案中,蛋白融合的连接处基于原蛋白的胞外域与跨膜结构域之间的预测的氨基酸边界。与基于外显子的融合相比,例如,这个方法可以在两个原结构域之间给融合蛋白加入部分的连接序列。

[0094] 融合蛋白的其他部分(SEQ ID NO:2),包括图4中显示的两个间隔区序列和OKT3序列。OKT3最初来自小鼠细胞,但已人源化,即被许多团体转换或突变成更接近来自人的抗体。人源化抗体或抗体片段是本领域普通技术人员已知的标准流程。图5显示接头蛋白样的ADCC增强子的完整序列(SEQ ID NO:3),其中该CD64的细胞外部分通过柔性的丝氨酸-甘氨酸连接子与去免疫化和人源化的OKT3(dhOKT3)融合。在可选的实施方案中,可以使用其他激动性抗-CD3序列,例如人源化的TR66。

[0095] 现在参见图6,CD64-dhOKT3融合蛋白是逆翻译的(back translated)和序列最优化的来生成图中显示的DNA序列(SEQ ID NO:4)。该最优化依赖于选择在人类中更加频繁出现的个别氨基酸密码子及移除重复区域和移除可能形成二级结构的区域的结合。

[0096] 本发明可选的实施方案包括加入标签(例如,Myc或His)使易于纯化。另一个选择可以是使标签可裂解以便纯化蛋白在用于治疗时不受标签的干扰。两种方案可以通过本领域普通技术人员所熟知的标准程序实施,不在此详细的描述。

[0097] (2) 表达和纯化

[0098] CD64-dhOKT3融合蛋白的合成基因通过化学合成并克隆到哺乳动物表达载体上。使用Invivogen[®]商购的载体pVITRO2-MCS,但有许多常用载体可以提供相同的功能。对于表达,重组表达载体按照制造商的说明书转染Expi293细胞(商购于Thermo Fisher Scientific)。生成的细胞系产生可溶性分泌蛋白(图7和8)。简单地说,Expi293细胞在Expi293表达培养基(Expi293Expression media)中生长,用ExpiFectamine293转染试剂转

染。转染后16-20小时合成的ADCC增强子1和2(图7)进入到培养基中,转染后2-7天收集上清液。在本发明可选的实施方案中,使用其他的表达系统,例如,CHO细胞。在一个可选的实施方案中,表达盒可以稳定的整合到细胞系的基因组中,以形成稳定的衍生细胞,产生融合蛋白。

[0099] ADCC增强子蛋白用通常已知的方法亲和纯化,例如商购的IgG Sepharose柱(GE Healthcare Life Sciences)(图8)。简单地说,将来自转染的细胞的上清液上样到装有与人IgG交联的Sepharose珠的柱子上。然后用中性pH缓冲液和阶梯式梯度的更低pH的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液清洗柱子。ADCC增强子蛋白在低pH(\sim pH 3)下洗脱,然后立即在1M TrisHCl(pH 7.4)中中和。缓冲液通过透析或超滤交换。

[0100] 也可以使用其他的标准纯化方法,如脱盐柱。另一个可选的实施方案使用基于Protein L的亲和柱。Protein L结合许多种蛋白的kappa链,包括scFv的kappa链,例如本文融合蛋白的OKT3部分。纯化未加标签的蛋白的其他标准方法,例如,离子交换、分子筛等,也可以单独使用或在本发明中联合使用。可选地,如前所述,融合蛋白可以用标准标签标记,便于使用合适的亲和柱纯化。这些步骤也可以串联使用来产生更高纯度的蛋白。

[0101] (3) 结合亲和力

[0102] 可以以多种方式直接使用上清液或纯化蛋白来检测CD64-抗CD3融合蛋白结合Fc和CD3的能力。例如,如图9中所显示的,Jurkat细胞能用于检测该亲和力,因为Jurkat细胞是表达CD3的T淋巴细胞。根据一个实施例,在PBS中清洗 2×10^5 个Jurkat细胞,在50 μ l的培养液上清液(来自已转染表达载体数天的Expi293细胞)或纯化的融合蛋白中、于4 $^{\circ}$ C培养30分钟。细胞用PBS清洗两次,然后用商购的荧光素标记的抗-CD64抗体检测结合的ADCC增强子(图10)。在图11中,进行Jurkat细胞的结合滴定,结果显示结合与增强子浓度之间的相关性。

[0103] 有标签的蛋白,结合亲和力同样可以用荧光素标记的抗-标签抗体来检测。这个方法还可以用于检测覆盖利妥昔单抗的CD20⁺Daudi细胞对CD64结构域的结合(见图12)。简单地说,收集 10^6 个Daudi细胞,用PBS清洗,用0.1 μ g/ml的利妥昔单抗(抗CD20的抗体,又名Rituxan.MabThera和Zytux)、于4 $^{\circ}$ C培养30分钟。细胞在PBS中再洗清洗,然后如上所述的与上清液或纯化蛋白一起培养(图13)。在图14中,进行Daudi细胞的结合滴定,结果显示结合与增强子浓度之间非常相关。事实上,接头蛋白样的ADCC增强子对Fc或抗体的结合表现出比增强子另一端的对CD3的结合强约30倍。

[0104] 在可选的实施方案中,检测了在共同培养系统中覆盖利妥昔单抗的Daudi细胞和Jurkat细胞之间的异源聚合,作为结合亲和力的指标。Daudi细胞和Jurkat细胞分别用标准方法用活细胞染色(例如CFSE或Cell Trace Far Red)标记,和/或被改造以表达荧光蛋白,例如GFP。然后将该细胞与利妥昔单抗及本发明的可溶性ADCC增强子共同培养。检测双峰的FACS数据,两种颜色都是阳性的。本领域普通技术人员容易理解,本文描述的实施方案中的细胞系的选择不局限于Jurkat细胞和Daudi细胞——本发明考虑多种细胞系或原代细胞与合适的抗体联合使用。

[0105] CD64-抗CD3融合蛋白结合Fc和CD3的能力还可以用表面等离子共振,或其他标准的生化或基于细胞的试验来检测。

[0106] (4) 细胞毒性增强

[0107] 用标准程序从捐赠血液中分离Naïve原代CD8⁺T细胞,例如,使用RosetteSep CD8 T Cell Enrichment试剂盒(Stem Cell Technology),接着用抗-CD3/CD28扩大。可选地,可以用总T细胞或PBMCs来进行类似实验。使用这些细胞的任何一种,检测本发明的增强子引起活化、增殖和引发细胞毒作用(尤其是,ADCC)的能力。具体地,T细胞的增殖可以通过流式细胞术或其他传统方法来检测,例如,胸苷掺入法、CFSE稀释法等。活化可以通过检测多种已知的活化标志物来检测,例如,HLA-DR、CD25、CD69等。典型地,对于这些实验,增强子可以单独起作用,但进行附加试验需要或不需要有:

[0108] (A) 50IU/ml的IL-2;

[0109] (B) 靶细胞;和/或

[0110] (C) 合适的抗体

[0111] 当包括靶细胞,它们可以用丝裂霉素C预先处理,以停滞增殖和最小化过度拥挤的效果。同样,溶酶体-相关的膜蛋白-1(LAMP-1或CD107a)已描述是作为CD8⁺T细胞和NK细胞刺激后溶解颗粒脱粒化的标志物。因此,在上文所述的共同培养实验中,通过流式细胞术可以分析CD107a⁺T细胞的水平来检测脱粒化。

[0112] 为了评价细胞毒性,在合适的治疗抗体存在下将T细胞与CellTrace-标签的靶细胞共同培养一天或两天。在图15-23中显示了几个实施例的结果和设置,提供了接头蛋白样的增强子引起、增强或扩大抗体依赖性细胞毒性来对抗多种癌症细胞的能力的足够的证据。在这些图中展示的数据包括有效杀伤B淋巴母细胞(Daudi和Raji)、乳腺癌细胞(SK-BR3和MDA-MB-231)和表达PD-1的细胞(293-PD1)。

[0113] 例如,图15和16中展示的数据和机制显示,本发明的增强子在Rituxan存在下,通过招募T细胞影响ADCC,能够杀伤许多的CD20⁺Daudi细胞群。如另一个实施例,图19中展示的数据显示本发明的增强子引发Herceptin(设计的抗乳腺癌细胞上的HER2受体的抗体)对SK-BR3乳腺癌细胞的杀伤能力,其大概是因为增强子招募了T细胞来增强ADCC。

[0114] 可以用其他抗体在其他癌症细胞系或环境中进行额外的试验,例如:(a)用抗-CD33抗体(WM-53)处理的CD33+AML系(例如,HL-60、MOLM-13和THP-1);(b)用抗-CD19抗体(HIB19)处理的CD19+系(例如,NALM-6和MEC-1);和(c)用抗-EpCAM抗体(HEA-125)处理的EpCAM+系(例如,SW480)。

[0115] 现在参见图23,细胞毒性实验包含纳武单抗(抗-PD1抗体)、有转基因表达的PD1(“293T-PD1”)的HEK-293T细胞(表达大T抗原的人胚肾细胞)、CD8⁺T细胞和本发明的增强子。对照包括亲本、未修饰的HEK-293T细胞(“293T”)及IgG4对照。纳武单抗被开发成IgG4抗体以便无任何ADCC活性。然而,后续实验已显示,ADCC和PD1抗体一起可能作用更好。和CD16不同,CD64有能力结合IgG4,并将原始ADCC-阴性的抗体(例如,纳武单抗)转变成ADCC-阳性的抗体,为了从其他免疫效应细胞,如T细胞获得额外的帮助。如图中显示,纳武单抗本身,即使当它的浓度提高10倍,仍只有有限的杀伤靶293T-PD1细胞的能力—显示约75%的靶细胞存活。然而,当把本发明的接头蛋白样的增强子加入到混合物中,靶细胞的存活率大幅下降至少于5%。这为本发明增强子结合或联合IgG4抗体或没有ADCC能力的其他免疫效应细胞的有希望的治疗用途提供了基础。

[0116] 本文包含的数据支持将接头蛋白样的ADCC增强子与抗体(例如Rituxan和Herceptin)一起使用,以增强它们的功能,减少抗体用量,减少副作用和抗-抗体应答。

[0117] 这些作用不仅仅在于治疗癌症,也治疗自身免疫。例如,Rituxan或利妥昔单抗在治疗自身免疫患者中产生了混合的结果:它在RA中作用很好但在SLE中作用略微。这个的其中一个原因是在SLE患者中巨噬细胞介导的B细胞的缺失是饱和的。用ADCC增强子作为T细胞接头蛋白将B细胞杀伤重新定向到T细胞将避免这个问题。

[0118] 进一步地,可以在有低亲和力形式的CD16 (158F) 的患者中,或其ADCC/CDC被以某种方式抑制的患者中(例如,慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者) 和其他正在经受癌症治疗的患者中使用增强子。

[0119] 有许多抗体,直到这些抗体已经用于临床才发现ADCC在其中的作用,例如,曲妥珠单抗、抗-PD-1、抗-PD-L1、抗-CTLA4等。这些抗体中许多是IgG4抗体。如上所示,增强子的CD64部分能结合IgG4,并如上文显示的将原始ADCC-阴性抗体转变成ADCC-阳性抗体。

[0120] 对本领域技术人员显而易见的是,在不背离本发明的范围或精神的条件下,在本发明中可以做出多种修改和变化。通过对本文公开发明的说明书和实践的考虑,本发明的其他实施方案将对本领域的技术人员而言是显而易见的。说明书和实施例应该被认为仅是示例性的,而本发明的真实范围和精神由权利要求说明。

[0121] 在整个申请中,参考多种出版物、专利和/或专利申请以更全面地描述本发明所属的领域的现状。这些出版物、专利和/或专利申请公开的全部内容在此并入作为参考,在同样程度上,正如每一个独立的出版物、专利和/或专利申请是特定地和单独地说明并入作为参考。



图1



图2

CD64 胞外域（基于外显子的）（SEQ ID NO:1）

1-281

MWFLTTLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQT
STPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDK
LVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLN
ASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWC
EAATEDGNVLKRSPELELQVL

图3

间隔区+hOKT3（SEQ ID NO:2）

SSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKSSGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGY
TNYNQVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSSVE
GGSGGSGGSGGSGGVDDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIY
DTSKVASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYCQWSSNPLTFGQGTKLQIT

图4

融合蛋白 (SEQ ID NO:3)

MWFLTLLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVEEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTPS
YRITSASVNDSEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYY
RNGKAFKFFHWSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNL
VTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSP
ELQVLSSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKSSGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGY
TNYNQKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSSVEGGSGG
SGGSGSGGVDIQTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKVASGVP
SRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYCQQWSSNPLTFGQGTKLQIT

图5

融合基因 (SEQ ID NO:4)

ATGTGGTTTCTGACTACACTGCTGCTGTGGGTGCCCGTGGATGGACAGGTGGATACTACAAAAGC
CGTGATTACACTGCAGCCCCCTTGGGTGTCTGTCTTCCAGGAGGAAACCGTGACACTGCACTGCG
AGGTCCTGCATCTGCCAGGCAGCTCCTCTACCCAGTGGTTTCTGAACGGAAGTGTACCCAGACA
TCTACTCCCAGTTACCGCATCACAAGCGCATCCGTGAATGACAGCGGCGAGTATCGATGCCAGCG
GGGGCTGTCAGGTCGAAGCGATCCAATCCAGCTGGAAATTCACCGGGGTGGCTGCTGCTGCAGG
TGAGTTCAAGGGTCTTACCGAGGGTGAACCCCTGGCACTGAGGTGTCACGCCTGGAAGGACAAA
CTGGTGTACAACGTCTGTACTATAGAAATGGCAAGGCCTTCAAGTTCTTTTCAATTGGAACAGCAA
TCTGACTATCCTGAAGACCAACATTTCTCACAATGGAACCTACCATTGCAGCGGAATGGGGAAGC
ATCGCTATACTTCTGCTGGGATCAGTGTGACCGTCAAAGAACTGTTCCAGCTCCCGTGTGAAC
GCATCCGTCACATCTCCTCTGCTGGAGGGGAATCTGGTGACACTGTCTGTGAAACTAAGCTGCT
GCTGCAGCGGCCAGGACTGCAGCTGTACTTCTCCTTTTATATGGGCTCTAAAACCTGAGAGGAC
GCAACACAAGCTCCGAGTACCAGATTCTGACTGCCCGGAGGGAAGACAGCGGGCTGTATTGGTGC
GAGGCCGCTACCGAAGATGGTAATGTGCTGAAGAGGTCCCCCGAGCTGGAAGTGCAGGTGCTGTC
TAGTGGCGGAGGGGGTAGTCAGGTGCAGCTGGTCCAGTCCGGAGGAGGAGTGGTCCAGCCTGGCA
GGTCACTGAGACTGAGCTGTAAGTCAAGCGGATACACCTTCACAAGATATACTATGCACTGGGTG
CGCCAGGCTCCTGGTAAAGGACTGGAGTGGATCGGGTACATTAACCCTAGCAGAGGTTACACAAA
CTATAATCAGAAGGTGAAAGACCGCTTCACAATCTCCCGAGATAACTCTAAAAATACTGCCTTTC
TGCAGATGGACTCCCTGAGACCTGAGGATACCGGCGTGTACTTTTGCCTCGCTACTATGACGAT
CATTACTGTCTGGATTATTGGGGACAGGGGACCCAGTGACAGTCTCCTCTGTGGAAGGTGGCAG
TGGAGGGTCAGGTGGCAGCGGAGGGTCCGGTGGAGTGGACGATATCCAGATGACCCAGTCTCCCA
GTTCACTGTCTGCCAGTGTGGGCGACCGGGTCACTATTACCTGCAGGGCTAGCTCCTCTGTGAGC
TACATGAATTGGTATCAGCAGACCCCTGGCAAGGCACCAAAACGATGGATCTACGATACCAGTAA
GGTGGCCTCAGGAGTCCCAAGCCGTTCTCAGGTAGCGGCTCCGGAACAGACTATACCTTCACCA
TCAGTTCACTGCAGCCTGAGGATATTGCCACTTACTATTGTGAGCAGTGGAGTAGTAATCCTCTG
ACATTCGACAGGGAACCAAACTGCAGATCACA**TAA**

图6

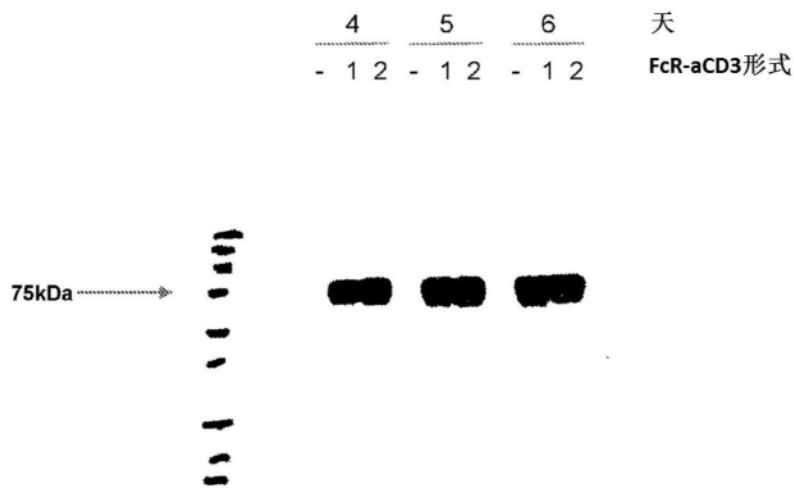


图7

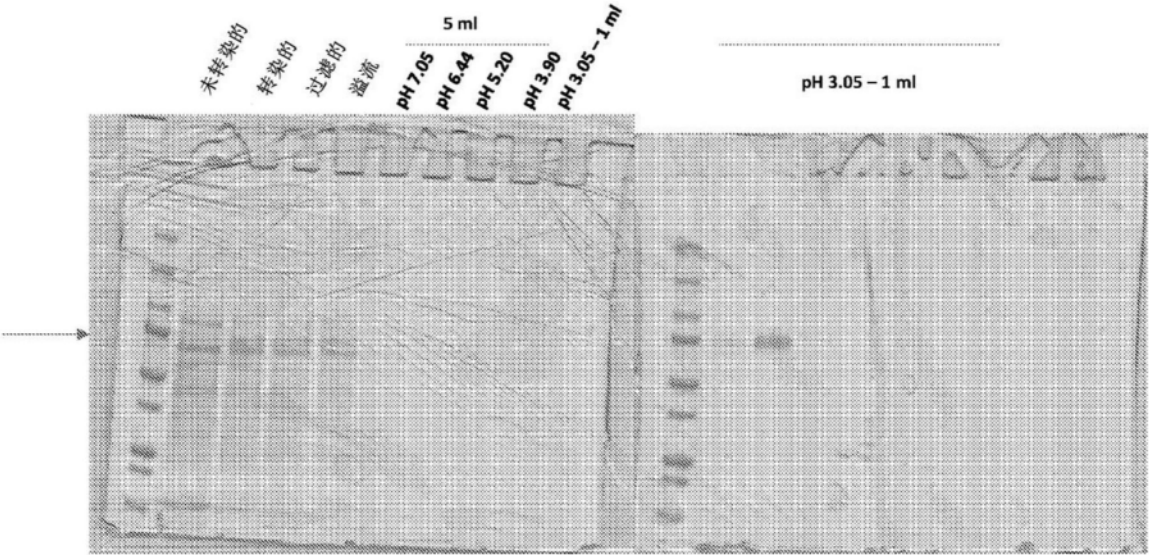


图8

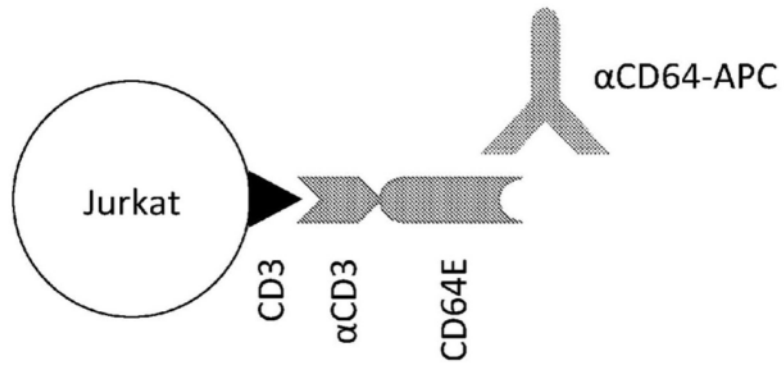


图9

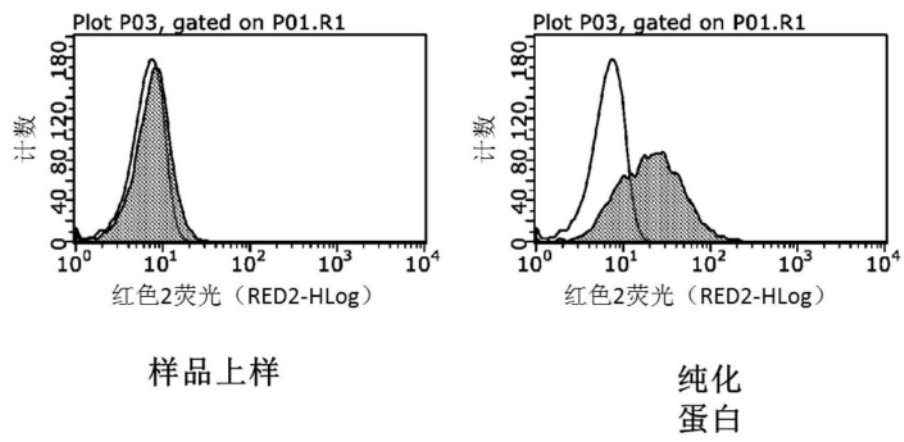


图10

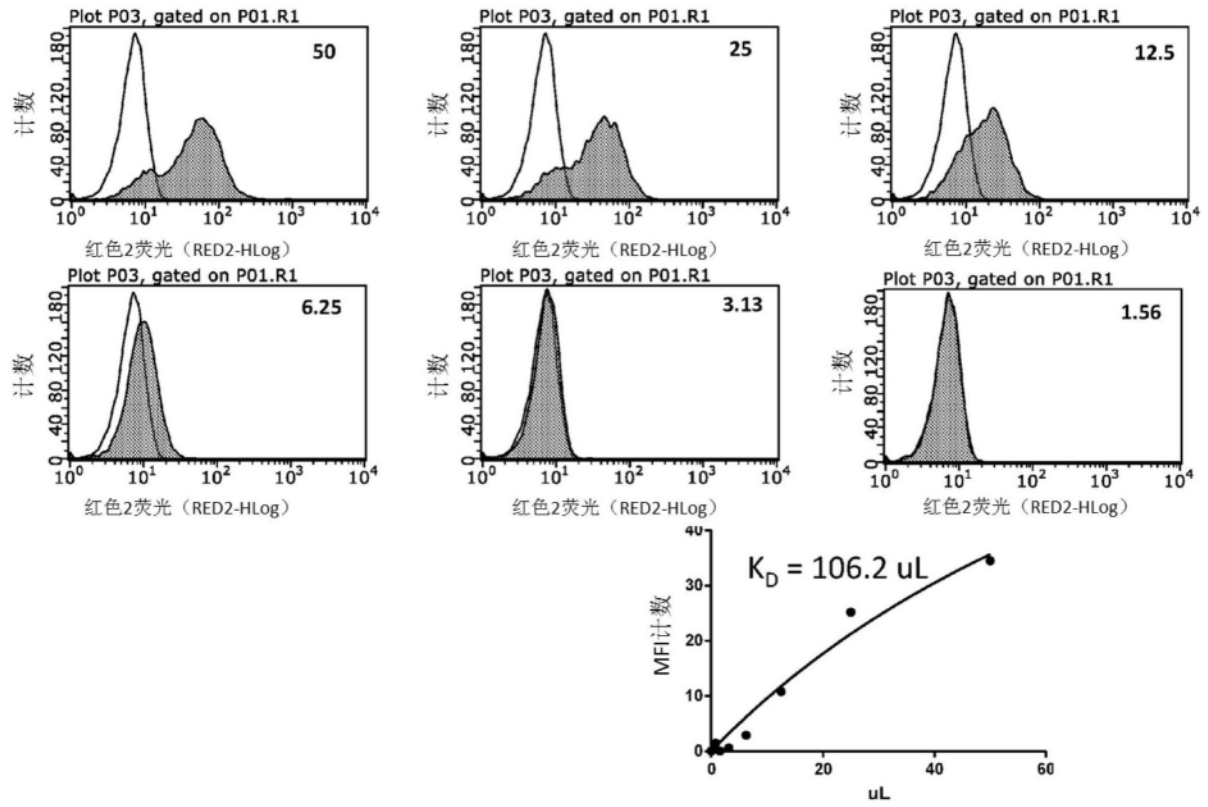


图11

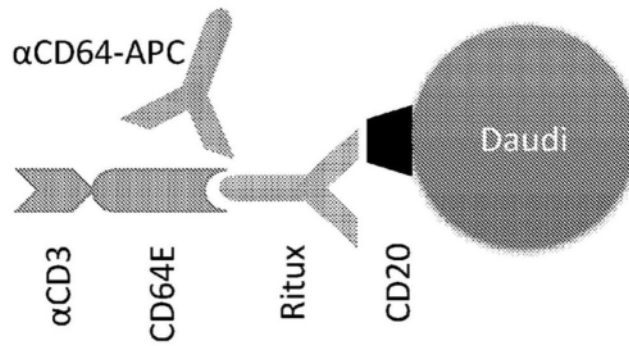


图12

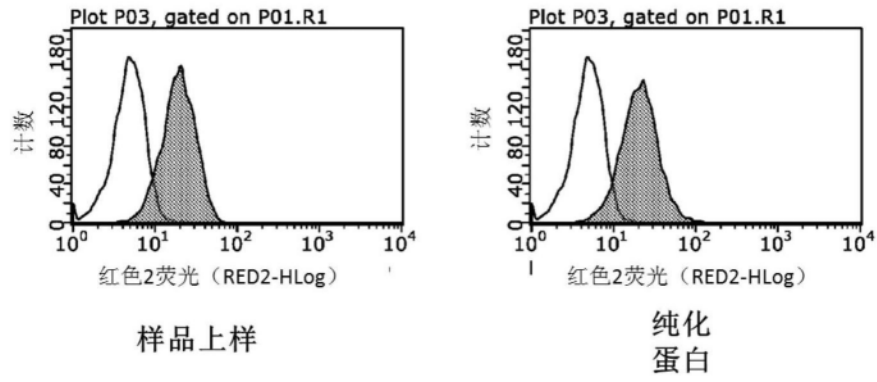


图13

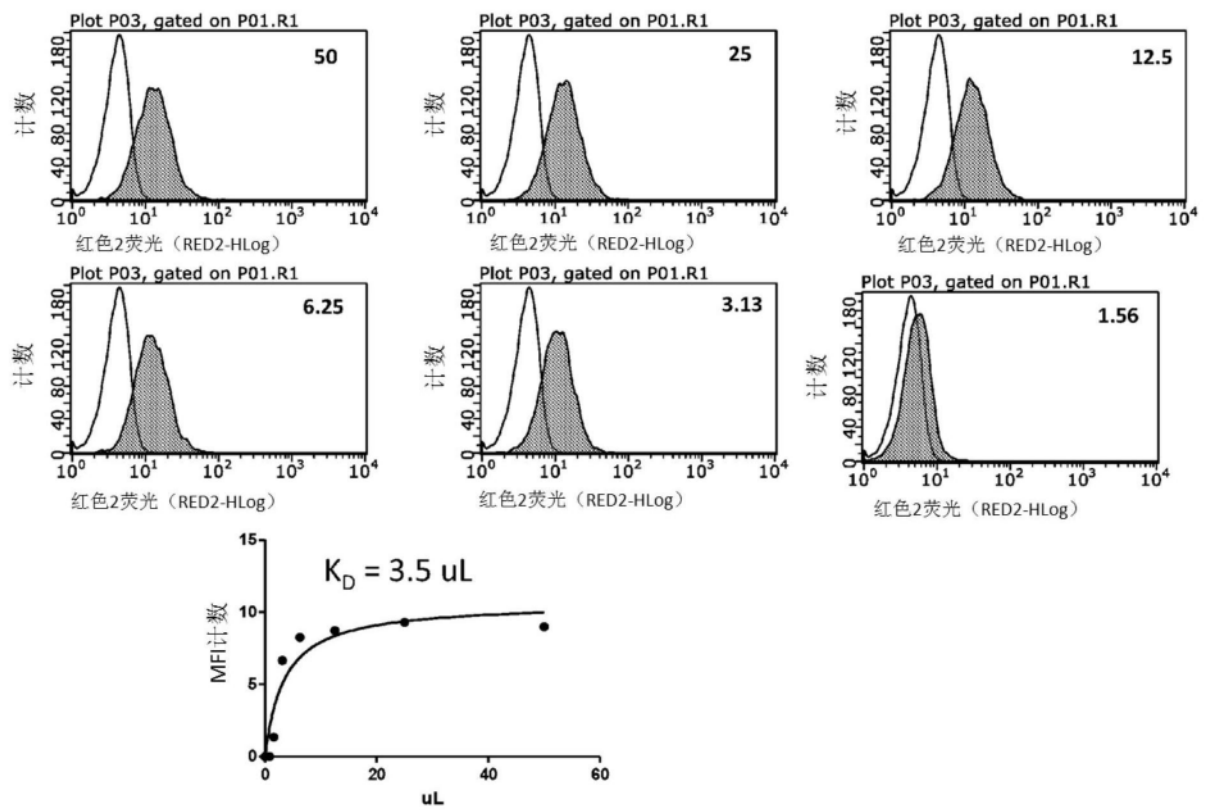


图14

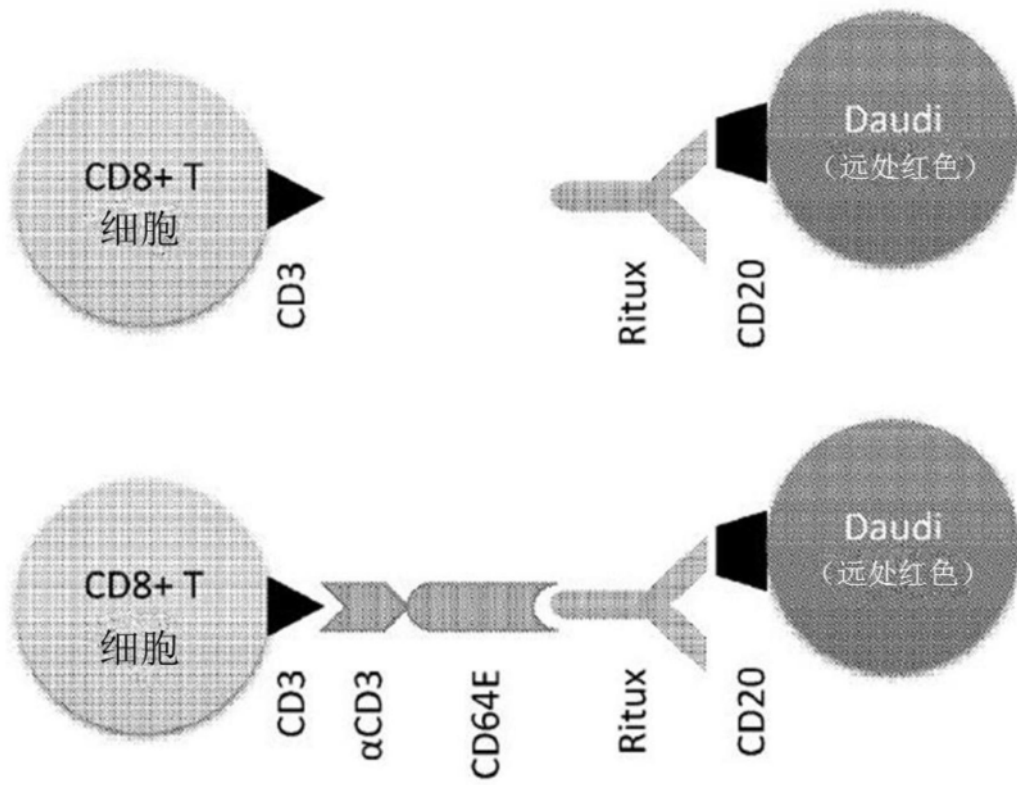


图15

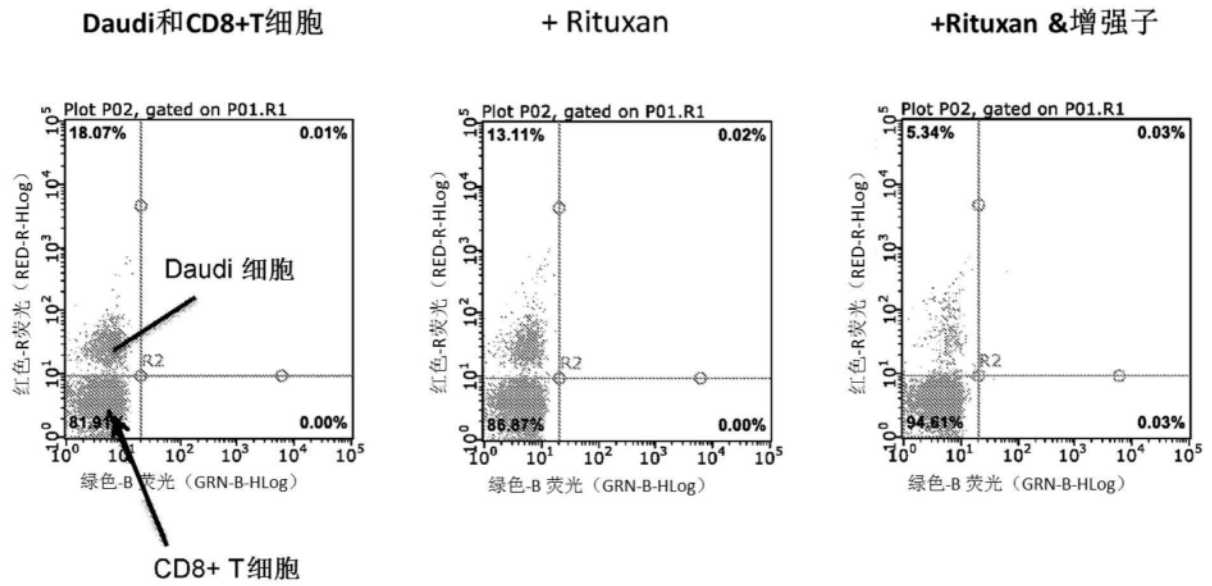


图16

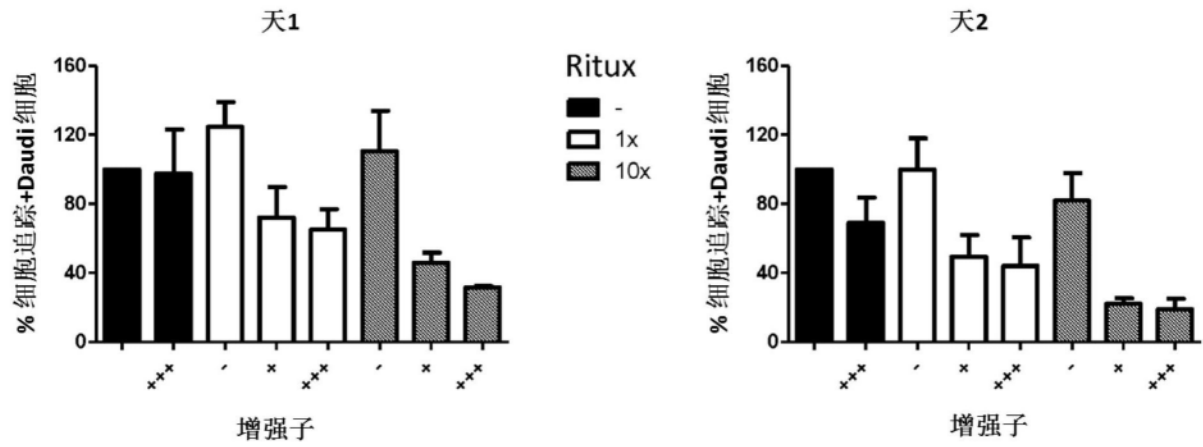


图17

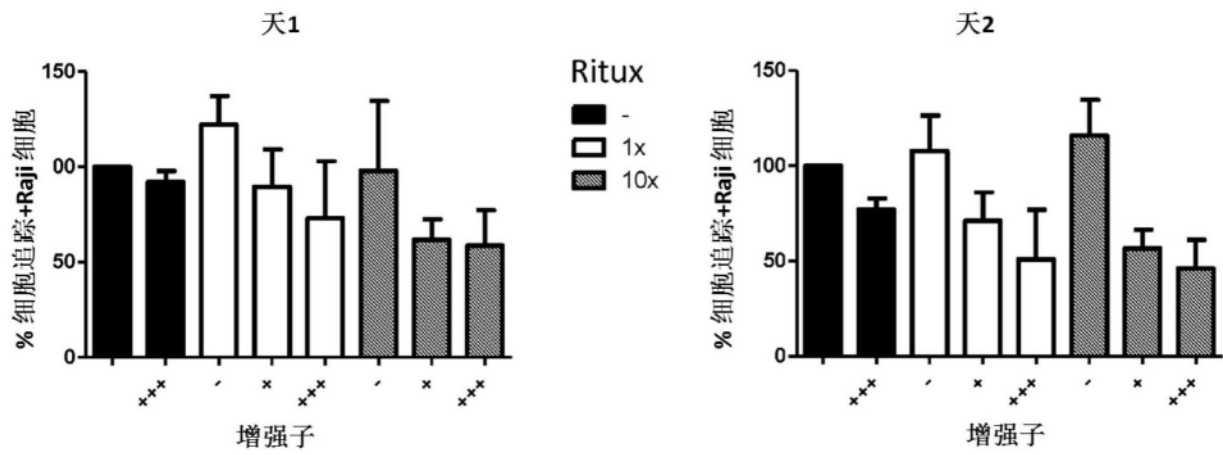


图18

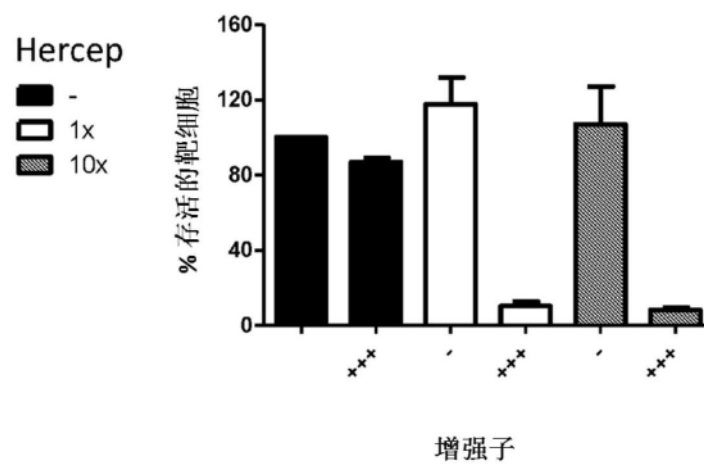


图19

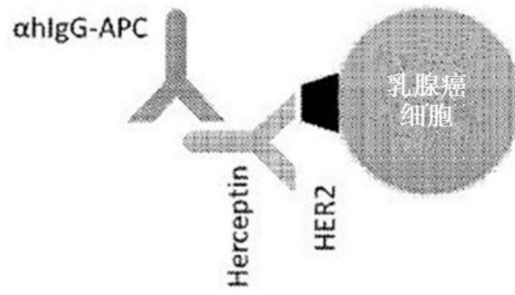


图20

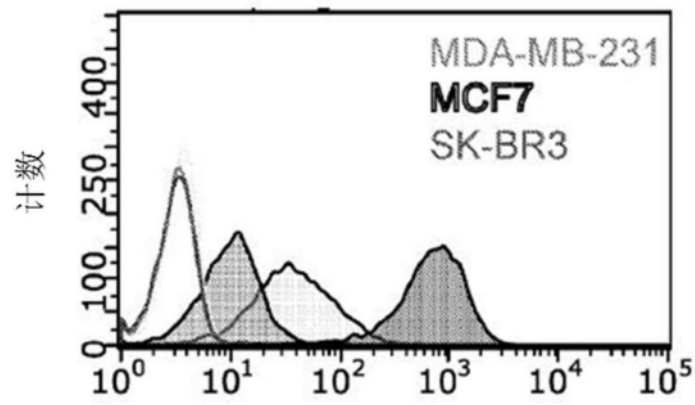


图21

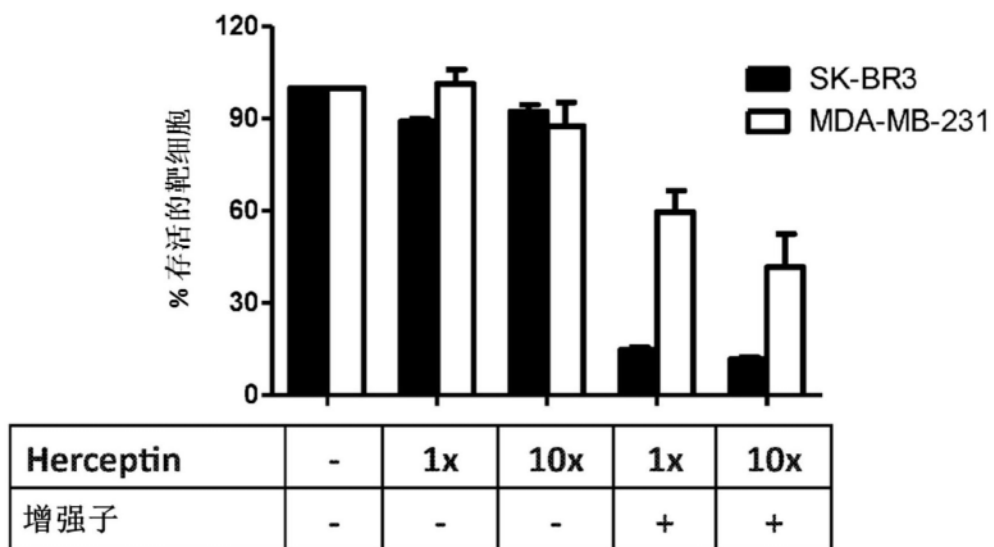


图22

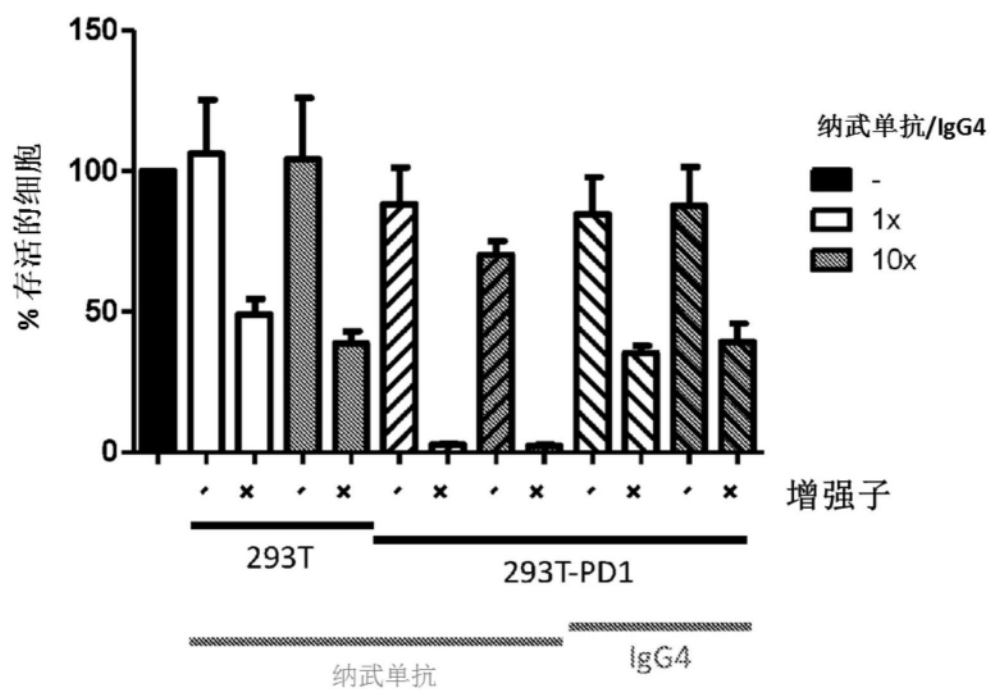


图23